

Un atemperado tras el tratamiento de CO₂ previene el pardeamiento interno de caqui durante la frigoconservación

Una causa importante de pérdidas postcosecha de caqui 'Rojo Brillante' es el pardeamiento de la pulpa que puede manifestarse tras la conservación frigorífica o envíos en frío a ultramar. El caqui 'Rojo Brillante' es un cultivar astringente por lo que durante el manejo postcosecha el fruto es sometido a un tratamiento de desastringencia con altas concentraciones de CO₂. En este estudio se evaluó la influencia de la temperatura a la que es mantenido el fruto durante el periodo inmediatamente posteriormente al tratamiento de CO₂ en la incidencia de pardeamiento de la pulpa tras una frigoconservación prolongada. Nuestros resultados mostraron que fruta que tras el tratamiento de CO₂ fue transferida directamente a la cámara de frigoconservación a 1 °C manifestó pardeamiento interno tras una conservación de 40 días, mientras que fruta que fue atemperada durante 24 horas a T^a amb tras la desastringencia, antes de ser transferida a la cámara de frigoconservación, no manifestó la alteración. Este periodo de atemperado fue clave para que el fruto liberase el CO₂ concentrado en su interior a la salida del tratamiento de desastringencia, lo que resultó en una menor acumulación no sólo de CO₂, sino también de acetaldehído, en el momento de entrar en la cámara de frío. Nuestra hipótesis preliminar es que una acumulación excesiva de acetaldehído en el momento de la entrada en la cámara frigorífica puede actuar como precursor de especies reactivas de oxígeno (ROS), que podrían estar implicadas en el desarrollo del pardeamiento. Se hace necesario evaluar en futuros estudios cuál es el periodo mínimo de atemperado necesario para prevenir la alteración.

PALABRAS CLAVE: caqui, atemperado, pardeamiento, intercambio gaseoso, respiración.

A. Fathi-Najafabadi, A. Salvador, P. Navarro, R. Gil, C. Besada

Centro de Tecnología Postcosecha del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia, España.

e-mail: besada_cri@gva.es

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la manifestación de pardeamiento interno tras la conservación frigorífica es una causa importante de pérdidas postcosecha en caqui 'Rojo Brillante', ya que ni las causas de esta alteración ni su forma de control están claras.

Este pardeamiento se manifiesta inicialmente en la zona central del fruto para ir posteriormente extendiéndose hacia las zonas más externas. Este desorden se ha observado principalmente tras periodos prolongados de frigoconservación o envíos a ultramar a bajas temperaturas, lo que puede llevar inicialmente a pensar que se trata de un síntoma de daño por frío. Sin embargo, la sensibilidad a las bajas temperaturas y los síntomas de daño por frío han sido estudiados en profundidad en esta variedad de caqui, y este tipo de pardeamiento interno no se ha descrito como uno de ellos (Salvador *et al.*, 2004;

Pérez-Munera *et al.*, 2009). Por lo tanto, otros factores además de la temperatura de conservación deben de estar implicados en la manifestación de esta alteración.

En lo que se refiere al manejo del caqui 'Rojo Brillante', cuando la fruta va a ser frigoconservada o enviada en contenedores refrigerados es previamente sometida al tratamiento de 1-metilciclopropano (1-MCP) (Smartfresh®), con el fin de retrasar los síntomas de daño por frío, principalmente el ablandamiento y gelificación de la pulpa (Besada *et al.*, 2008; Pérez-Munera *et al.*, 2009). Además, debido al carácter astringente de esta variedad, toda la fruta debe recibir el tratamiento de desastringencia con altas concentraciones de CO₂ antes de ser comercializada. Las condiciones recomendadas son 95 % CO₂-20 °C-24 h (Salvador *et al.*, 2007).

Cuando la fruta va a ser conservada a bajas temperaturas por periodos prolongados se recomienda aplicar el tratamiento de CO₂ tras la conservación para preservar así la firmeza del fruto. Sin embargo, en los envíos a ultramar es necesario aplicar el tratamiento previamente al envío. En estas situaciones es recomendable atemperar el fruto durante 12-24 horas tras la aplicación del CO₂, antes de someterlo a bajas temperaturas, con el objetivo de garantizar la efectividad del tratamiento. Sin embargo, debido a las dificultades logísticas de los almacenes, esta práctica de atemperado no siempre se realiza.

En este contexto, en este estudio se investiga el efecto de la temperatura a la que es mantenido el fruto en el periodo que media entre la finalización del tratamiento de CO₂ y el paso a la cámara de frigoconservación, en la incidencia del pardeamiento interno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Vegetal y Tratamientos

Caquis (*Diospyros kaki* Lf.) cv. Rojo Brillante fueron recolectados en l'Alcudia a mitad de campaña. Tras la recolección se trasladaron al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), donde fueron seleccionados de acuerdo al color y ausencia de defectos. Un lote de 20 frutos se usó para determinar el estado de madurez [índice de color 6.8, firmeza de 53 N y contenido de taninos solubles de 0.6 % p.f.].

El resto de la fruta fue tratada con 1-MCP (500 nL L⁻¹ de 1-MCP durante 24 h a T^a ambiente). Posteriormente la fruta recibió el tratamiento de desastringencia con altas concentraciones de CO₂ en condiciones estándar (95 % CO₂ - 20 °C-24 h). A la salida de la cámara de CO₂ la fruta fue dividida en dos lotes: uno fue directamente transferido a una cámara de conservación a 1 °C; el otro lote se mantuvo durante 24 h a temperatura ambiente (15 °C ± 2 °C) (periodo de atemperado) antes de ser transferido a la cámara frigorífica de 1 °C.

Toda la fruta fue almacenada durante 40 días a 1 °C y posteriormente se simuló un periodo de comercialización de 3 días a 20 °C. La fruta fue evaluada periódicamente durante la conservación frigorífica y tras el periodo de comercialización. Para ello, y tal como se muestra en la **Figura 1**, se realizaron evaluaciones de 20 frutos por tratamiento en los siguientes momentos:

Día 1: la fruta fue evaluada inmediatamente tras el tratamiento de CO₂ (0h) y transcurridas 2, 4, 6, y 24 horas (2h, 4h, 6h, y 24h) en cada una de las condiciones ensayadas. Es decir, la fruta transferida directamente a la cámara frigorífica llevará el correspondiente número de horas a 1 °C, mientras que la fruta sometida al periodo de atemperado llevará el

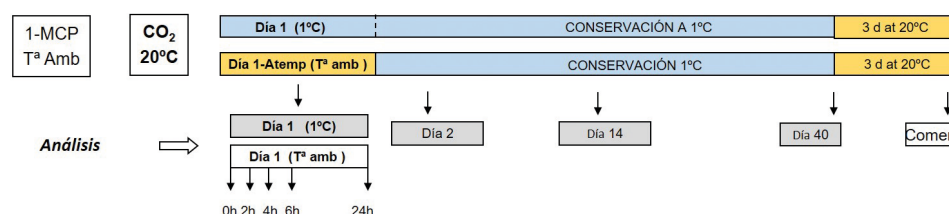


Figura 1. Esquema del ensayo realizado. Los puntos de análisis están indicados con flechas.

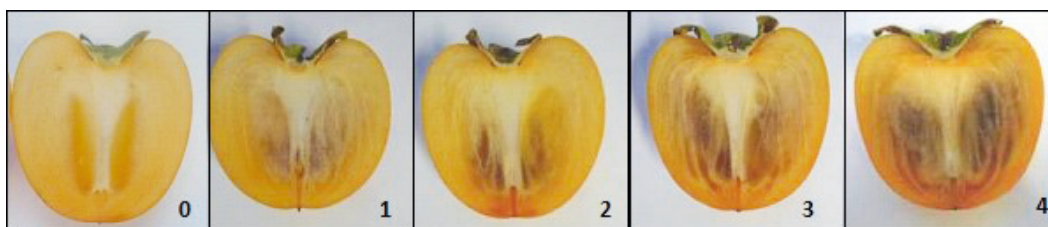


Figura 2. Escala de evaluación de pardeamiento: 0 = ausencia, 1 = pardeamiento ligero en menos del 50 % de la pulpa, 2 = pardeamiento intenso en menos del 50 % de la pulpa, 3 = pardeamiento intenso en 50-70 % de la pulpa, y 4 = pardeamiento intenso en más del 70 % de la pulpa.

correspondiente número de horas a temperatura ambiente. Los parámetros evaluados fueron los siguientes: contenido de taninos solubles (TS), concentración de acetaldehído (ACh) y etanol (EtOH) en zumo, y liberación de ACh y EtOH. Además, transcurridas 24 horas (24h) se evaluó también la liberación de CO₂ y el nivel de astringencia sensorial del fruto.

Día 2: transcurridas 48 horas desde la finalización del tratamiento de CO₂, se realizaron nuevamente los análisis previamente mencionados. En este momento la fruta transferida directamente a frío llevaba 2 días a 1 °C y la fruta atemperada llevaba 1 día a temperatura ambiente más 1 día a 1 °C.

Día 14 y Día 40: tras 14 y 40 días de almacenamiento en frío se realizó nuevamente el análisis de la fruta. Además, tras los 40 días de conservación se simuló un periodo de comercialización, analizándose nuevamente la fruta tras 3 días a 20 °C.

Además de los parámetros anteriormente mencionados, tras 14 y 40 días de frigoconservación, y tras el posterior periodo de comercialización, se determinó también la incidencia de desórdenes externos e internos.

40 días a 1 °C + 3 días a 20 °C

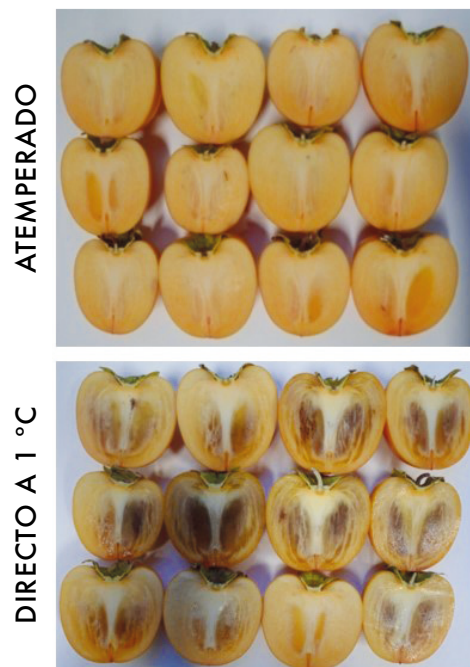


Figura 3. Aspecto interno de la fruta tratada con CO₂ y transferida directamente a 1 °C o bien atemperada previamente durante 24 horas a T^a amb. Las imágenes corresponden al aspecto de la fruta tras 40 días a 1 °C más 3 días a 20 °C.

Determinaciones Analíticas

La firmeza y el índice de color fueron determinados sobre 20 frutos siguiendo la metodología descrita por Novillo *et al.* (2014). El color fue expresado como IC= 1000a/Lb, siendo 'L', 'a' y 'b' los parámetros de Hunter. La firmeza fue expresada como la fuerza en Newton (N)

necesaria para romper la pulpa y se midió en la zona ecuatorial del fruto, tomando medidas en dos caras opuestas de cada fruto tras retirar la piel.

El contenido de taninos solubles (TS) y la concentración de Acetaldehído (AcH) y Etanol (EtOH) en el zumo se determinaron sobre tres frutos individuales en cada momento de análisis. Para ello se utilizó respectivamente el método Folin-Denis descrito por Taira (1996) y el método descrito por Besada *et al.* (2016). Los resultados de TS se expresaron como % peso fresco, y la concentración de AcH y EtOH en zumo como mg 100 mL⁻¹.

Por otra parte, se determinó la cantidad de CO₂, AcH y EtOH liberada desde el fruto hacia el exterior. Este análisis se realizó sobre tres frutos individuales, los cuales fueron introducidos en frascos de cristal de 1L que fueron sellados herméticamente. En el Día 1 la fruta se mantuvo cerrada en el bote durante 30 minutos mientras que en las mediciones posteriores se mantuvieron los frutos durante 2 horas. Tras estos periodos se analizó el espacio de cabeza de cada uno de los frascos mediante cromatografía de gases según las condiciones descritas por Novillo *et al.* (2014). El CO₂ liberado se expresó como mL kg⁻¹ h⁻¹ mientras que el AcH y EtOH fueron expresados como µL kg⁻¹ h⁻¹.

El nivel de astringencia de los frutos en los diferentes puntos de análisis fue evaluado por un panel de expertos mediante una escala de 5 puntos desde 1-no astringente hasta 5-muy astringente. La fruta fue cortada en rodajas longitudinales de 1.5 cm de grosor y colocada en pocillos metálicos codificados con tres dígitos. Cada juez evaluó tres frutos de cada lote.

Por último, la incidencia y severidad de pardeamiento fue evaluada tras los 14 y 40 días de conservación, así como tras el posterior periodo de comercialización. Para ello se evaluaron 20 frutos por tratamiento

y se utilizó la escala siguiente para la evaluación de la severidad (**Figura 2**).

Para evaluar en su conjunto la incidencia y severidad de este desorden, se utilizó el siguiente índice de pardeamiento (IP), que toma valores desde 0 a 1, calculado de acuerdo a Khademi *et al.* (2013):

$$IP = \frac{\sum [(severidad \text{ de pardeamiento}) \times (n^{\circ} \text{ de fruto con cada severidad})]}{n^{\circ} \text{ total de frutos} \times 4}$$

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) realizado con el paquete estadístico Statgraphics Plus Versión 5.1. Las diferencias entre las medidas se establecieron a través de intervalos LSD (diferencia mínima significativa) con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

Desórdenes externos e internos

Durante todo el periodo de estudio la fruta mostró un buen aspecto externo, sin incidencia de alteraciones. La evaluación interna reveló que tras 14 días de conservación toda la fruta presentaba un aspecto interno sano, sin incidencia de pardeamiento. Sin embargo, tras 40 días de conservación a 1 °C la fruta que había sido transferida directamente desde la cámara de CO₂ a la cámara de frigoconservación mostraba síntomas de pardeamiento interno con un

índice de pardeamiento (IP) de 0.24 mientras que esta alteración no se manifestó en aquella fruta que había sido atemperada durante 24 horas previamente a ser transferida a la cámara frigorífica.

La severidad del pardeamiento en la fruta que no había sido atemperada se vio claramente incrementada tras la simulación de las condiciones de comercialización, alcanzando un IP superior a 0.5. En la **Figura 3** se muestra el aspecto interno de fruta atemperada y no atemperada tras el periodo de comercialización.

Taninos Solubles y Evaluación Sensorial de la Astringencia

En la **Figura 4** se muestra la evolución de la concentración de taninos solubles (TS) en la fruta durante el periodo de ensayo. La aplicación del CO₂ provocó un descenso de los TS desde 0.6% en recolección hasta 0.2 % inmediatamente tras el tratamiento (D1-0h), momento en el que el nivel de astringencia fue evaluado por el panel de expertos como “astringencia media”. Durante las horas siguientes al tratamiento el contenido de TS descendió gradualmente, y lo hizo de forma más rápida en la fruta que fue atemperada que en la fruta transferida directamente a baja temperatura. Así, transcurridas 6 horas tras la finalización del tratamiento, la fruta atemperada tenía un contenido de TS de 0.02 % y fue evaluada como “no astringente”, mientras que la

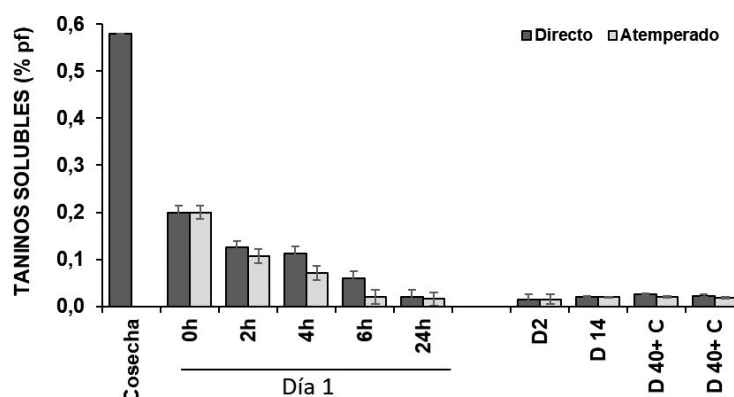


Figura 4. Evolución de la concentración de taninos solubles (% pf) en caqui sometido al tratamiento de desastringencia (95 % CO₂-24h-20 °C) y posteriormente transferido directamente a una cámara frigorífica a 1 °C (directo) o atemperado previamente a T^a amb durante 24 h (atemperado). Toda la fruta fue conservada durante 40 días a 1 °C más 3 días a 20 °C Las barras verticales representan el intervalo LSD (p = 0.05).

fruta transferida directamente a frío presentaba un contenido de TS de 0.05%, detectándose "astringencia residual". Tras 24 horas ya no se observaron diferencias en el contenido de TS entre los tratamientos, presentando toda la fruta un contenido de TS de 0.02% y siendo "no astringente". Como era de esperar, estos valores no sufrieron cambios durante el almacenamiento posterior.

Concentración de Acetaldehído (ACh) y Etanol (EtOH) en zumo

El tratamiento de CO₂ provocó un incremento del nivel de ACh desde valores cercanos a cero en recolección hasta valores de 1 mg 100mL⁻¹ inmediatamente tras el tratamiento (D1-0h) (**Figura 5A**). Durante las 6 h posteriores al tratamiento la concentración de ACh en el interior del fruto siguió incrementando gradualmente, sin observarse diferencias entre la fruta atemperada y la que había sido transferida directamente a frigoconservación. Sin embargo, transcurridas 24 h se observaron diferencias claras entre ambos tipos de fruta. En la fruta atemperada se observó un descenso brusco en la concentración de ACh hasta valores por debajo de 1 mg 100mL⁻¹, mientras que en la fruta no atemperada, que ya llevaba 24 h a 1 °C, la concentración siguió incrementando hasta valores 5 mg 100mL⁻¹.

En el Día 2, los niveles de ACh se incrementaron tanto en la fruta atemperada como en la no atemperada, pero los niveles fueron significativamente mayores en la fruta que había sido transferida directamente a 1 °C. A medida que avanzó la conservación, los niveles de ACh descendieron y se igualaron entre ambos tipos de fruta, alcanzando valores cercanos a 3 mg 100mL⁻¹. Sin embargo, la simulación de la comercialización a 20 °C hizo que el contenido de ACh incrementase de forma significativa en la fruta no atemperada, mientras que se mantuvo estable en la fruta que había sido atemperada.

Respecto a la concentración de EtOH (**Figura 5B**), el tratamiento de CO₂ causó una acumulación importante de este gas en el interior del fruto, pasando de valores cercanos a cero en recolección a valores superiores a 30 mg 100mL⁻¹ inmediatamente después del tratamiento. Durante las 24 h posteriores al tratamiento, la concentración de EtOH de la fruta que fue directamente transferida a 1 °C se mantuvo en niveles constantes, mientras que la fruta atemperada experimentó un descenso gradual de la concentración de EtOH hasta valores cercanos a 23 mg 100mL⁻¹ tras 24 horas. Por lo tanto, igual que se había observado en el caso del ACh, también la concentración de EtOH fue significativamente mayor en la fruta no atemperada que en la atemperada transcurridas 24 h tras el tratamiento.

En el Día 2 se observó un incremento en la concentración de EtOH hasta valores cercano a 40 mg 100mL⁻¹ sin

diferencias entre la fruta atemperada y no atemperada. Durante la posterior conservación se observó un descenso en la concentración de EtOH en ambos tipos de fruta, pero este fue más acusado en la fruta atemperada. Así, tras 40 días a 1 °C la concentración de EtOH fue significativamente mayor en la fruta directamente transferida a 1 °C que en la que había sido atemperada. Tras la simulación de la comercialización, se produjo una ligera disminución en la concentración de EtOH, presentando la fruta no atemperada una mayor concentración de EtOH.

Liberación de CO₂, ACh y EtOH

En la **Figura 6** se muestra la liberación de CO₂ desde el interior del fruto al exterior. Los valores en cosecha fueron de 7.2 mL kg⁻¹ h⁻¹, lo que correspondería a la respiración habitual del fruto. Inmediatamente tras la aplicación del tratamiento de desastringencia los valores de liberación de CO₂ se incrementaron

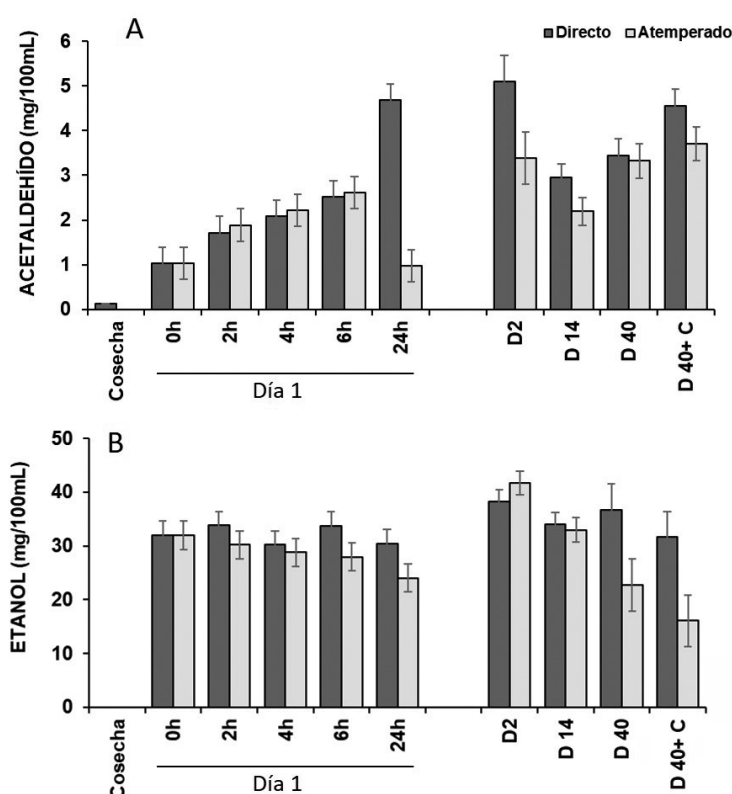


Figura 5. Evolución de la concentración de Acetaldehído (A) y Etanol (B) (mg 100mL⁻¹) en caqui sometido al tratamiento de desastringencia (95 % CO₂-24h-20 °C) y posteriormente transferido directamente a una cámara frigorífica a 1 °C (directo) o atemperado previamente a T^a amb durante 24 h (atemperado). Toda la fruta fue conservada durante 40 días a 1 °C más 3 días a 20 °C. Las barras verticales representan el intervalo LSD (p = 0.05).

de manera drástica. Estos valores tan elevados corresponden a la difusión hacia el exterior del CO_2 que se ha acumulado en el interior del fruto durante el tratamiento y que es liberado cuando el fruto es llevado nuevamente a una atmósfera de aire. Es por este motivo que en este trabajo hablamos de liberación de CO_2 y no de respiración.

En los momentos inmediatamente posteriores al tratamiento de CO_2 (durante la media hora que duró la medición) se observaron diferencias claras entre la fruta atemperada y la no atemperada. La liberación de CO_2 fue significativamente menor ($140 \text{ mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en la fruta que se encontraba a 1°C , que en la fruta que estaba siendo atemperada

($230 \text{ mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Durante las 24 h siguientes la liberación de CO_2 se redujo gradualmente, pero durante las 6 primeras horas siguió siendo mayor en la fruta atemperada que en la que se encontraba en la cámara frigorífica. En el Día 2 los niveles de liberación de CO_2 descendieron drásticamente hasta valores cercanos a los de cosecha y se mantuvieron sin cambios durante la posterior conservación en frío, sin diferencias significativas entre la fruta atemperada y no atemperada. Durante el periodo de comercialización los valores incrementaron ligeramente hasta valores de $13\text{-}15 \text{ mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en toda la fruta.

Paralelamente a la liberación de CO_2 , se determinó también la liberación del AcH y EtOH desde el fruto al exterior (**Figura 7A y 7B**). La liberación de AcH y EtOH durante las primeras cuatro horas posteriores al tratamiento fue mayor en la fruta atemperada que en la que había sido transferida directamente a 1°C . Tras 24 h la liberación de ambos gases descendió significativamente en ambos tipos de fruta, sin observarse diferencias entre ellas. La medición realizada el Día 2 mostró un descenso importante en la tasa de liberación, pero a partir de este momento los valores se mantuvieron relativamente constante durante la conservación, sin diferencias importantes entre fruta atemperada y no atemperada. Cuando la fruta fue transferida a 20°C para simular la comercialización, se observó un incremento en la liberación de AcH y EtOH, que fue más elevado en la fruta transferida directamente a 1°C que en la fruta que había sido atemperada

DISCUSIÓN

La evaluación de la incidencia y severidad de pardeamiento tras la conservación de 40 días a 1°C reveló que el pardeamiento interno se manifestó únicamente en aquella fruta que tras el tratamiento de CO_2 había sido transferida directamente a la cámara frigorífica. Se hizo por tanto evidente, que el periodo de atemperado previo a

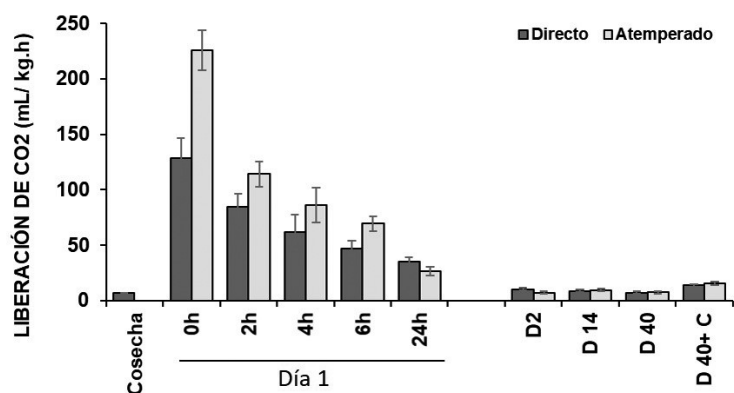


Figura 6. Evolución de la liberación de CO_2 ($\text{mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en caqui sometido al tratamiento de desastringencia ($95\% \text{ CO}_2\text{-}24\text{h-}20^\circ\text{C}$) y posteriormente transferido directamente a una cámara frigorífica a 1°C (directo) o atemperado previamente a $T^\circ \text{ amb}$ durante 24 h (atemperado). Toda la fruta fue conservada durante 40 días a 1°C más 3 días a 20°C . Las barras verticales representan el intervalo LSD ($p = 0.05$).

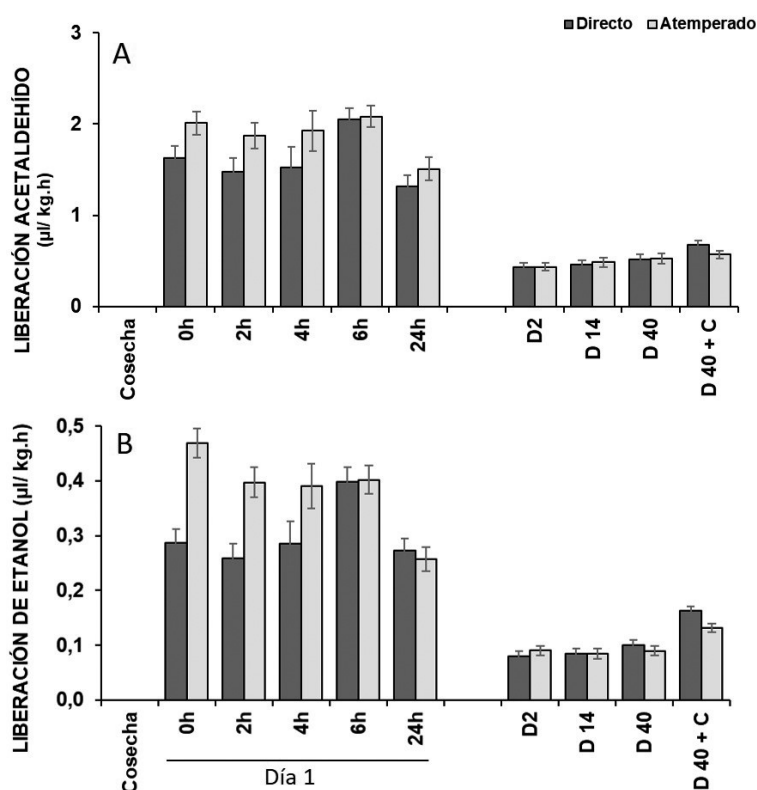


Figura 7. Evolución de la liberación de AcH y EtOH ($\mu\text{L kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en caqui sometido al tratamiento de desastringencia ($95\% \text{ CO}_2\text{-}24\text{h-}20^\circ\text{C}$) y posteriormente transferido directamente a una cámara frigorífica a 1°C (directo) o atemperado previamente a $T^\circ \text{ amb}$ durante 24 h (atemperado). Toda la fruta fue conservada durante 40 días a 1°C más 3 días a 20°C . Las barras verticales representan el intervalo LSD ($p = 0.05$).

la frigoconservación fue el factor decisivo para evitar este desorden.

El tratamiento de desastringencia con CO₂ es un proceso que consiste en dos fases: 1) Una fase de inducción en la que fruta debe ser mantenida en altas concentraciones de CO₂ por un periodo de tiempo determinado, y durante la cual se acumulan AcH y EtOH como resultado de la respiración anaerobia, y comienza la insolubilización de los taninos mediante la reacción taninos-AcH. 2) Una segunda fase en la que la astringencia sigue desapareciendo gradualmente sin que la presencia de CO₂ sea necesario (Gazit y Adato, 1972). Estas dos fases son dependientes de la temperatura (Matsuo and Ito, 1977).

De acuerdo con esto, nuestros resultados mostraron que el proceso de insolubilización de taninos durante el periodo inmediatamente posterior al tratamiento (fase 2) fue más rápido en la fruta mantenida durante 24 h a temperatura ambiente que en la fruta que se transfirió directamente a 1 °C.

La temperatura también fue clave en el proceso de liberación de gases desde el interior del fruto hacia el exterior. Durante el tratamiento de desastringencia, además del AcH y EtOH acumulado debido a la respiración anaerobia, también tuvo lugar una acumulación de CO₂. La capacidad de la fruta para liberar estos gases en las horas posteriores al tratamiento dependió claramente de la temperatura a la que se mantuvo el fruto. Así, durante el periodo de atemperado de 24 h a T^a amb tras el tratamiento de desastringencia se produjo una liberación de estos tres gases más rápida que en el caso de que la fruta fue directamente pasada a la cámara de frío. Esto puede explicarse por el efecto que la temperatura y presión tienen en el coeficiente de difusión de los gases en general (Welty *et al.*, 1984). La tasa de difusión incrementa con la temperatura ya que las moléculas se mueven más rápidamente, y decrece a medida que incrementa la presión, ya que

se concentran más moléculas en un mismo volumen, y por lo tanto se dificulta su movimiento.

En la fruta directamente transferida a 1 °C, la menor capacidad de liberar CO₂ a baja temperatura llevó a que la respiración anaerobia se prolongase, con una consecuente acumulación de AcH. Esta acumulación de AcH durante las 24 h posteriores al tratamiento parece ser clave en el desarrollo del pardeamiento.

La implicación de altos niveles de AcH (ligados a estados de anaerobiosis) en desórdenes de pardeamiento interno ha sido previamente descritos en otras frutas. En pera, situaciones de anoxia pueden llevar a la aparición de pardeamiento en la zona central del fruto (Ho *et al.*, 2010), lo que se ha relacionado, al igual que en este estudio, con una baja capacidad de los tejidos para facilitar el intercambio de gases, (Ho *et al.*, 2006; Verboten *et al.*, 2008). Debido a la capacidad del AcH de actuar como promotor de especies reactivas de oxígeno (ROS), conocidas por su capacidad de oxidar y dañar las células (Fan *et al.*, 2005; Zhan *et al.*, 2015), la acumulación de este gas puede resultar en daños celulares.

En este sentido, en caqui se ha demostrado que las especies ROS están implicadas en la manifestación de otro tipo de pardeamiento, concretamente el pardeamiento por daño mecánico, en el que provocan una oxidación de taninos que se visualiza en forma de pardeamiento en aquellas zonas donde el fruto ha sido golpeado. En este tipo de pardeamiento se ha demostrado que el AcH generado durante el proceso de desastringencia con CO₂ desencadena la acumulación de las especies ROS (Novillo *et al.*, 2014). Por lo tanto, es posible que también en el pardeamiento interno que tiene lugar tras conservaciones prolongadas, los mayores niveles de AcH observados en la fruta no atemperada estén implicados en la acumulación de especies ROS, y que estas sean las causantes últimas del pardeamiento.

Esta hipótesis concuerda con el hecho de que este pardeamiento no se manifieste en conservaciones cortas (14 días) pero sí tras conservaciones prolongadas (40 días). Las membranas celulares son una barrera que de forma natural evita que las especies ROS entren en contacto con los taninos. Sin embargo, se ha visto que las membranas sufren una degradación gradual durante la conservación a bajas temperaturas (Salvador *et al.*, 2007). Por lo tanto, el debilitamiento de las membranas celulares que tiene lugar durante las conservaciones prolongadas facilitaría que las especies ROS, generadas debido a una elevada concentración de AcH en el momento en que la fruta entra a la cámara de frío, puedan provocar procesos de oxidación.

Por otra parte, nuestros resultados también mostraron una mayor acumulación de EtOH en el momento en que se manifestó el pardeamiento en la fruta no atemperada. Elevadas concentraciones de EtOH también se han mostrado como indicadores de desórdenes de pardeamiento en frutos como la manzana (Fan *et al.*, 2005).

En resumen, nuestros resultados demuestran que la temperatura a la cual se mantiene el fruto durante el periodo inmediatamente posterior al tratamiento de desastringencia con CO₂ es un factor clave en el desarrollo de la alteración de pardeamiento interno que ocurre tras la conservación frigorífica. Un periodo de atemperado de 24 h a T^a amb tras la desastringencia y previamente a la entrada de la fruta en cámara frigorífica facilita la liberación del CO₂ hacia el exterior del fruto, lo que resulta en una menor acumulación de AcH, factor que parece ser clave para prevenir el pardeamiento. Por lo tanto, en aquellos caquis que vayan a ser frigoconservados es recomendable llevar a cabo un periodo de atemperado tras el tratamiento de desastringencia con el fin de minimizar el riesgo de pardeamiento tras la conservación. En este punto se hace necesario realizar más estudios

para determinar cuál es el periodo de atemperado mínimo que permite evitar esta alteración.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria de España (INIA) a través de los proyectos RTA 2013-00043-C02-01 y RTA2017-00045-C02-01 con el apoyo de fondos FEDER. También se ha recibido financiación por parte del IVIA a través del N° 51910 (cofinanciado por los fondos FEDER).

BIBLIOGRAFÍA

- Apel K., Hirt H.** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. of Plant Biol.* 55, 373-399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Besada C., Arnal L., Salvador A.** 2008. Improving storability of persimmon cv. Rojo Brillante by combined use of preharvest and postharvest treatments. *Postharvest Biol. and Technol.* 50, 169 - 175. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.05.013>
- Besada C., Arnal L., Salvador A., Martínez-Jávega J. M.** 2010. Optimization of the duration of deastringency treatment depending on persimmon maturity. *Acta Hort.* 858, 69 - 74. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2010.858.7>
- Besada C., Gil R., Bonet L., Quiñones A., Intrigliolo D., Salvador A.** 2016. Chloride stress triggers maturation and negatively affects the postharvest quality of persimmon fruit. Involvement of calyx ethylene production. *Plant Physiol. and Biochem.* 100, 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.01.006>
- Drew M.C.** 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 48, 223-250. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.223>
- Fan L., Song J., Forney C., Jordan A.** 2005. Ethanol production and chlorophyll fluorescence predict breakdown of heat-stressed apple fruit during cold storage. *J. of American Hort. Sci.* 130(2), 237-243. <https://doi.org/10.21273/jashs.130.2.237>
- Gazit S., Adato I.** 1972. Effect of carbon dioxide atmosphere on the course of astringency disappearance of persimmon fruits (*Diospyros Kaki* L.). *J. of Food Sci.* 37, 815-817. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1972.tb03676.x>
- Gottreich M., Blumenfeld A.** 1991. Light microscopic observations of tannin cell walls in persimmon fruit. *J. of Hort. Sci.* 66, 731-736. <https://doi.org/10.1080/00221589.1991.11516205>
- Ho Q.T., Verlinden B.E., Verboven P., Vandewalle S., Nicolai B.M.** 2006. A permeation-diffusion-reaction model of gas transport in cellular tissue of plant material. *J. of Exp. Bot.* 57, 4215-4224. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl198>
- Ho Q.T., Verboven P., Mebatsion H.K., Verlinden B.E., Vandewalle S., Nicolai B.M.** 2009. Microscale mechanisms of gas exchange in fruit tissue. *New Phytologist* 182, 163-174. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02732.x>
- Ho Q.T., Verboven P., Verlinden B.E., Nicolai B.M.** 2010. A model for gas transport in pear fruit at multiple scales. *J. of Exp. Bot.* 61, 2071-2081. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq026>
- Khademi O., Salvador A., Zamani Z., Besada C.** 2013. Effects of hot water treatments antioxidant enzymatic system in reducing flesh browning of persimmon. *Food and Bioprocess Technol.* 6, 3038-3046. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0959-6>
- Matsuo T., Ito S.** 1977. On mechanisms of removing astringency in persimmon fruits by carbon dioxide treatment I. Some properties of the two processes in the de-astringency. *Plant and Cell Physiol.* 18, 17-25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a075409>
- Novillo P., Salvador A., Navarro P., Besada C.** 2015. Involvement of the redox system in chilling injury and its alleviation by 1-Methylcyclopropene in 'Rojo Brillante' persimmon. *HortSci.* 50, 570-576. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.4.570>
- Novillo P., Salvador A., Llorca E., Hernando I., Besada C.** 2014. Effect of CO₂ deastringency treatment on flesh disorders induced by mechanical damage in persimmon. *Biochemical and Microstructural Studies. Food Chem.* 145, 453-463. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.054>
- Pérez-Munuera I., Hernando I., Larrea V., Besada C., Arnal L., Salvador A.** 2009. Microstructural study of chilling injury alleviation by 1-methylcyclopropene in persimmon. *HortSci.* 44, 742 -745. <https://doi.org/10.21273/hortsci.44.3.742>
- Purvis AC.** 2001. Reduction of superoxide production by mitochondria oxidizing NADH in the presence of organic acids. *J. of Plant Physiol.* 158, 159-165. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00128>
- Salvador A., Arnal L., Monterde A., Cuquerella J.** 2004. Reduction of chilling injury symptoms in persimmon fruit cv. Rojo Brillante by 1-MCP. *Postharvest Biol. and Technol.* 33, 285-291. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.03.005>
- Salvador A., Arnal L., Besada C., Larrea V., Quiles A., Pérez-Munuera I.** 2007. Physiological and structural changes during ripening and deastringency treatment of persimmon fruit cv. 'Rojo Brillante' Postharvest Biol. and Technol. 46, 181-188. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.05.003>
- Taira S.** 1996. Astringency in persimmon, in: Linskens, H.F., Jackson J.F.(Eds.), *Fruit Analysis*. Springer, Germany, pp. 97-110. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79660-9_6
- Verboven P., Kerckhofs G., Mebatsion H.K., Ho Q.T., Temst K., Wevers M., Cloetens, P., Nicolai B.M.** 2008. Three-dimensional gas exchange pathways in pome fruit characterized by synchrotron X-ray computed tomography. *Plant Physiol.* 147, 518-527. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118935>
- Welty J.R., Wicks C.E., Wilson R.E.** 1984. *Fundamentals of Momentum, Heat, and Mass Transfer*. John Wiley & Sons, New York.
- Yonemori, K., Oshida, M., Sugiura, A.** 1997. Fine structure of tannin cells in fruit and callus tissues of persimmon. *Acta Hort.* 436, 403-416. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1997.436.43>
- Zhang S., Bing Deng Y.S.** 2015. Exogenous carbon monoxide treatment delayed the ethanol metabolism and fruit softening of postharvest jujube. *Asian J. of Agri. and Food Sci.* 3(2), 196-204.